

(06)

# Polimorfizmy genów *HTRA1* rs11200638 oraz *ARMS2* rs10490924 i ich wpływ na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

## *HTRA1 rs11200638 and ARMS2 rs10490924 gene polymorphisms and response to intravitreal anti-VEGF treatment in patients with exudative age-related macular degeneration*

Agnieszka Kubicka-Trząska<sup>1</sup>, Izabella Karska-Basta<sup>1</sup>, Sylwia Dziedzina<sup>2</sup>, Marek Sanak<sup>2</sup>,  
Bożena Romanowska-Dixon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Katedry Okulistyki  
Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon

<sup>2</sup> Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marek Sanak

### Abstrakt:

**Cel:** określenie związku między polimorfizmami genów *HTRA1* rs11200638 i *ARMS2* rs10490924 a ich wpływem na efekt leczenia doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i bevacizumabu u chorych na wysiękowe zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

**Material i metody:** badaniami objęto 104 chorych. W ocenie skuteczności leczenia porównywano wyjściową najlepszą skorygowaną ostrość wzroku oraz grubość centralnej siatkówki w obrazie optycznej koherentnej tomografii z badaniami kontrolnymi wykonywanymi co miesiąc. Brak pozytywnej reakcji na leczenie definiowano jako brak poprawy ostrości wzroku lub jej pogorszenie o co najmniej 1 linię wg skali Snellena oraz redukcję centralnej grubości siatkówki CRT o  $\leq 10\%$ . Okres obserwacji wyniósł 6 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 61 osób, u których wykluczono obecność zmian zwyrodnieniowych w plamce. Badania przeprowadzono za pomocą genotypowania technologią TaqMan firmy Applied Biosystems.

**Wyniki:** w grupie chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem najczęściej występował genotyp AA w polimorfizmie *HTRA1* rs11200638, który 12-krotnie zwiększał ryzyko zachorowania w porównaniu do ryzyka u osób bez tego genotypu ( $p = 0,0028$ ). Występowanie genotypu AA polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 wykazywało tendencję do promowania niekorzystnej reakcji na wyniki leczenia anty-VEGF, ale bez istotności statystycznej. Spośród 22,11% chorych, u których nie stwierdzono pozytywnej reakcji na leczenie anty-angiogenne (non-responders), genotyp AA w polimorfizmie genu *HTRA1* rs11200638 był obecny w 59,25% przypadków. W przypadku polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 najczęściej u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem występował genotyp TT, który aż 14-krotnie zwiększał ryzyko zachorowania ( $p = 0,0000$ ). Żaden z genotypów polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 nie miał wpływu na reakcję na leczenie.

**Wnioski:** wyniki obserwacji wykazały, że polimorfizmy genów *HTRA1* rs11200638 i *ARMS2* rs10490924 w sposób istotny zwiększały ryzyko rozwoju zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Żaden z genotypów badanych polimorfizmów nie miał istotnego statystycznie wpływu na odpowiedź na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem.

### Słowa kluczowe:

*HTRA1*, *ARMS2*, polimorfizm genowy, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

### Abstract:

**Aim:** To analyze the correlation between *HTRA1* rs11200638 and *ARMS2* rs10490924 gene polymorphisms and the response to ranibizumab and bevacizumab in patients with age-related macular degeneration.

**Material and methods:** A hundred and four patients were enrolled. The response to treatment measured as the change of best corrected visual acuity and central retinal thickness from baseline was assessed at 4-week intervals for 6 months. No response to anti-VEGF therapy was defined as no improvement or deterioration of best corrected visual acuity  $\geq 1$  line (Snellen) and reduction in central retinal thickness  $\leq 10\%$  on optical coherence tomography after the loading phase.

The control group included 61 volunteers without age-related macular degeneration. In all cases, genetic probes (TaqMan Applied Biosystems) were used for testing.

**Results:** Most patients with age-related macular degeneration had AA genotype of *HTRA1* rs11200638 polymorphism which presence increases the risk of age-related macular degeneration 12-fold as compared to patients negative for this genotype

( $p = 0.0028$ ). The AA *HTRA2* rs11200638 genotype demonstrated a tendency towards worse response to anti-VEGF therapy, however the difference was not significant. Among 22.11% of non-responders, 59.25% of patients had genotype AA of *HTRA1* rs1100638. The genotype TT in *ARMS2* rs10490924 polymorphism was associated with a risk of age-related macular degeneration increased 14-fold as compared to individuals negative for this genotype ( $p = 0.0000$ ). There was no association between any of the *ARMS2* rs10490924 genotypes and the response to anti-VEGF therapy.

**Conclusions:** The study demonstrated the associations between *HTRA1* rs1100628 and *ARMS2* rs10490924 polymorphisms and a significantly increased risk of age-related macular degeneration. There was no association between any of the studied *HTRA1* and *ARMS2* polymorphism genotypes and the anti-VEGF therapy results.

**Key words:** *HTRA1*, *ARMS2*, genetic polymorphism, age-related macular degeneration.

**Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów w związku z publikowaną pracą/ The authors declare no conflict of interest**

## Wprowadzenie

Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (ang. Age-related Macular Degeneration – AMD) jest wiodącą przyczyną utraty widzenia centralnego u mieszkańców krajów wysoko rozwiniętych (1, 2). Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że ta choroba dotyka 13–29,7% populacji powyżej 55. roku życia (3). Główną przyczyną utraty widzenia plamkowego jest rozwój neowaskularyzacji naczyńwłkowej (ang. Choroidal Neovascularization – CNV), która jest charakterystycznym objawem wysiękowej postaci tego schorzenia. Chociaż patofizjologia wysiękowej postaci AMD jest nie do końca poznana, obecnie terapia tego schorzenia jest ukierunkowana na zahamowanie aktywności działających proangiogenne czynników, z których najważniejszą rolę odgrywa czynnik wzrostu śródbłonna naczyńwłkowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) (4). Aktualnie standardem postępowania w leczeniu wysiękowej postaci AMD jest terapia podawanymi doszkliskowo przeciwciałami skierowanymi przeciwko czynnikowi VEGF, do których należą ranibizumab, aflibercept oraz stosowany „off-label” bewacyzumab (5–7). Według doniesień miejscowa terapia anty-angiogenna jednak jest nieskuteczna u 20–35% chorych na AMD (5, 7). W tej grupie pacjentów określanych jako „non-responders” obserwuje się słabą odpowiedź na leczenie lub jej całkowity brak, to wiąże się z dalszą progresją choroby i postępującą utratą widzenia centralnego (5, 6). Uważa się, że słaba reakcja na leczenie lub jej brak są uwarunkowane genetycznie (8–11).

Wśród wariantów genowych bardzo silnie związanych z rozwojem AMD, obok polimorfizmu genu czynnika H układu dopełniacza *CFH* Y402H (rs1061170), wymienia się polimorfizmy genu kodującego proteazę serynową zależną od wysokiej temperatury 1 (ang. High Temperature Requirement A serine peptidase-1 – *HTRA1*) i genu wrażliwości rozwoju makulopatii związanej z wiekiem 2 (ang. Age-related Maculopathy Susceptibility-2 – *ARMS2*) (12–15). Pierwszy z nich reguluje aktywność komórkowego oraz insulino-podobnego czynnika wzrostu-1 (Insulin-growth Factor-1 – IGF-1), drugi koduje białko, którego funkcja nie została jeszcze poznana, po raz pierwszy wykryto je w łożysku, a następnie w komórkach siatkówki (16). Istnieją doniesienia wskazujące na istotne znaczenie polimorfizmów *HTRA1* rs11200638 oraz *ARMS2* rs10490924 jako czynników ryzyka rozwoju AMD, ich wpływ na kliniczny przebieg i reakcję na leczenie anty-angiogenne natomiast nie jest jednoznaczny (17–19).

## Cel

Celem pracy jest określenie związku między polimorfizmami genów *HTRA1* rs11200638 i *ARMS2* rs10490924 a ich wpływem

na efekt leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać AMD.

## Material i metody

Badaniami objęto 104 chorych leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i bewacyzumabu z powodu wysiękowej postaci AMD. We wszystkich przypadkach przeprowadzono wstępne badanie okulistyczne obejmujące ocenę najlepszej skorygowanej ostrości wzroku (ang. Best Corrected Visual Acuity – BCVA), pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego (ang. Intraocular Pressure – IOP), ocenę przedniego odcinka i dna oka, kolorową fotografię dna oka (fundus kamera Topcon-TRC-50DX, Japonia), badanie centralnej grubości siatkówki (ang. Central Retinal Thickness – CRT) w optycznej koherentnej tomografii (ang. Optical Coherence Tomography – OCT) (Topcon 3D OCT 2000, Japonia) oraz angiografię fluoresceinową (ang. Fluorescein Angiography – FA) (Topcon, TRC-50DX/A, Japonia). Badania kontrolne przeprowadzano co 4 tygodnie i obejmowały one wszystkie parametry badania wyjściowego z wyjątkiem FA. Okres obserwacji wynosił 6 miesięcy.

Leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (ranibizumab 0,5 mg/ 0,05 ml; bewacyzumab 1,25 mg/ 0,5 ml) obejmowało dwie fazy: fazę „nasycającą”, podczas której każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje czynnika anty-VEGF w odstępach miesięcznych, i fazę „podtrzymującą”, podczas której leczenie było prowadzone na podstawie wyniku badania klinicznego *pro re nata*, tj. „w razie potrzeby”.

Grupę kontrolną stanowiło 61 osób, które dobrano pod względem płci i wieku spośród osób operowanych w naszej klinice z powodu zaćmy starczej, u których wykluczono obecność AMD oraz innych schorzeń okulistycznych. W przeprowadzonych wywiadach lekarskich, zarówno w grupie chorych na AMD, jak i w grupie kontrolnej, nie stwierdzono rodzinnego występowania chorób dziedzicznych i nowotworowych.

Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej UJ (zgoda nr 122.6120.214.2016). Od każdego uczestnika uzyskano świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu oraz pobrano jednorazowo do oznaczeń genetycznych 5,0 ml pełnej krwi (Vacutainer K3EDTA). Z uzyskanego z tego materiału DNA zbadano polimorfizmy *HTRA1* rs11200638 i *ARMS2* rs10490924.

## Izolacja DNA

Do pełnej krwi dodawano 6-procentowy roztwór wielko-cząsteczkowego dekstranu (Dextran T500, Pharmacia) w celu sedymentacji erytrocytów. Bogate w leukocyty osocze odciągano i wirowano przez 10 min/ 20000 x g. DNA izolowano

z osadu leukocytów metodą Chomczyński i Sacchi (DNAzol 0,4 ml, Applied Biosystems). Ta metoda polega na lizie komórek izotiocyanianem guanidyny, który dzięki rozbiciu wiązań wodorowych, powoduje całkowite uwolnienie DNA z kompleksów jądrowych z białkami histonowymi. Po precipitacji DNA i przemyciu roztworem etanolu DNA było przechowywane w temperaturze -20°C w postaci roztworu wodnego.

#### Genotypowanie metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

DNA było amplifikowane w obecności swoistych starterów oraz sond oligonukleotydowych wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Podczas reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) była rejestrowana fluorescencja w dwóch kanałach barwnych odpowiadających użytym sondom swoistym dla każdego z genotypowanych wariantów nukleotydowych. Użyto komercyjnych zestawów starterów i sond TaqMan (TaqMan TaqMan Genotyping Assays). Reakcja amplifikacji była przeprowadzana na płytkach 96-dółkowych w termocyklerze 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Wykorzystano komercyjną mieszaninę reakcyjną zawierającą roztwory substratów i polimerazy; TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix, mieszaninę oligonukleotydowych starterów i sond oraz DNA połączono w objętościach zalecanych przez producenta i zgodnie z zaleconym profilem termicznym (TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems).

Odczyty genotypów zbadanych polimorfizmów zostały dokonane na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji

automatycznie, z wykorzystaniem oprogramowania SDS wersja 2.04 (Applied Biosystems).

#### Analiza statystyczna

W badanych grupach istotność różnic między częstością alleli i genotypów oceniano za pomocą testu Chi<sup>2</sup>. Analizę związku genotypów zbadanych polimorfizmów z występowaniem AMD przeprowadzono korzystając z modelu regresji logistycznej. Dla każdej pary obliczano wartość ilorazu szans (ang. Odds Ratio – OR) oraz przedział ufności – PU (95%). Wartości OR były następnie korygowane pod względem potencjalnych czynników zakłócających i podawane jako OR skorygowane. Analizę statystyczną i opracowanie wyników przeprowadzono z użyciem oprogramowania STATISTICA 10.0. Wartości  $p < 0,05$  uznano za statystycznie istotne.

#### Wyniki

W tabeli I przedstawiono szczegółową charakterystykę grupy chorych na AMD oraz grupy kontrolnej (tab. I).

U chorych na AMD zwraca uwagę znacznie częściej występujące obciążenie rodzinne tym schorzeniem niż u badanych z grupy kontrolnej ( $p = 0,003$ ). Analizowano zależność między wpływem kilku czynników takich jak płeć, wiek, palenie tytoniu, miejsce zamieszkania i pozytywny wywiad rodzinny w kierunku AMD, które potencjalnie zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju AMD, a ryzykiem rozwoju tego schorzenia niezależnie od badanych polimorfizmów genowych. W naszym materiale klinicznym płeć żeńska, wiek powyżej 60 lat, środowisko miejskie oraz pozytywny wywiad rodzinny istotnie zwiększały ryzyko

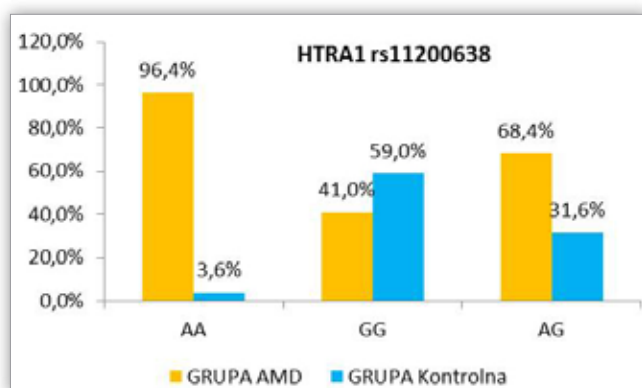
Badana cecha/ Characteristics	Grupa AMD/ AMD group liczba/ number n = 104	Grupa kontrolna/ Control group liczba/ number n = 61	p
<b>Płeć/ Sex</b>			0,0200
kobiety/ females	69 (66,3%)	32 (52,5%)	
mężczyźni/ males	35 (33,7%)	29 (47,5%)	
<b>Wiek/ Age</b>	56–90 lat (śr. 71,2 roku)	54–88 lat (śr. 68,4 roku)	0,0232
≤ 60 lat/ ≤ 60 years	12 (11,5%)	14 (23%)	
> 60 lat/ > 60 years	92 (88,5%)	47 (77%)	
<b>Palenie tytoniu/ Smoking</b>			0,0875
obecnie/ w przeszłości/ current/ former	31 (29,8%)	18 (29,5%)	
nigdy/ never	73 (70,2%)	43 (70,5%)	
<b>Miejsce zamieszkania/ Living environment</b>			0,0172
miasto/ urban	72 (69,2%)	39 (64%)	
wieś/ rural	32 (30,8%)	22 (36%)	
<b>Wywiad rodzinny/ Family history of AMD</b>			0,0030
pozytywny/ positive	24 (23,1%)	5 (8,2%)	
negatywny/ negative	80 (76,9%)	56 (91,8%)	

Tab. I. Charakterystyka grupy chorych na AMD oraz grupy kontrolnej.

Tab. I. Characteristics of AMD patients and control group.

wystąpienia AMD. Na uwagę zasługuje to, że w badanej grupie chorych nie wykazano istotnej statystycznie zależności między paleniem tytoniu, uważanym za jeden z najważniejszych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju AMD, a występowaniem tego schorzenia ( $p = 0,0875$ ).

Na rycinie 1. oraz w tabeli II przedstawiono proporcję osób z poszczególnymi allelami polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 w grupie AMD oraz w grupie kontrolnej. W grupie AMD najczęściej występującym genotypem w polimorfizmie *HTRA1* rs11200638 był genotyp AA. Aż w 96,4% przypadków stwierdzono go w grupie badanej i tylko w 3,6% w grupie kontrolnej. Najrzadziej natomiast w grupie chorych na AMD występował genotyp GG, którego proporcja występowania wynosiła 41% w stosunku do 59% w grupie kontrolnej. Oznacza to, że osoby posiadające genotyp AA były bardziej narażone na wystąpienie AMD, a ryzyko rozwoju choroby wzrastało u nich ponad



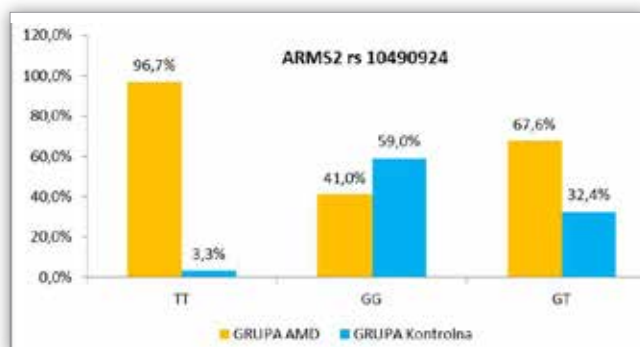
**Ryc. 1.** Proporcja osób z poszczególnymi genotypami polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 w grupie chorych na AMD i w grupie kontrolnej.

**Fig. 1.** Percentages of AMD patients and controls with various genotypes of *HTRA1* rs11200638 polymorphism.

12-krotnie w porównaniu z ryzykiem u osób z genotypem AG ( $p = 0,0028$ ). U osób z genotypem GG natomiast ryzyko zachorowania było prawie 3 razy mniejsze niż u osób z genotypem AG ( $p = 0,0000$ ) (tab. II).

W przypadku polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 w grupie chorych na AMD najczęściej stwierdzanym genotypem był genotyp TT, którego obecność wykazano aż u 96,7% chorych na AMD, podczas gdy w grupie kontrolnej występował on tylko u 3,3% osób. Z kolei genotyp GG polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 występował najrzadziej w grupie badanej; był on obecny odpowiednio u 41% chorych na AMD i u 59% osób z grupy kontrolnej (ryc. 2). Genotyp TT zwiększał ryzyko zachorowania na AMD 14-krotnie w porównaniu z genotypem GT ( $p = 0,0021$ ), podczas gdy genotyp GG zmniejszał je 3-krotnie ( $p = 0,0000$ ) (tab. III).

W okresie 6-miesięcznej obserwacji u 23 chorych (22,11%) obserwowano brak pozytywnej odpowiedzi na prowadzone miejscowe leczenie antyangiogenne. W grupie tych chorych po-



**Ryc. 2.** Proporcja osób z poszczególnymi genotypami polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 w grupie chorych na AMD i grupie kontrolnej.

**Fig. 2.** Percentages of AMD patients and controls with various genotypes of *ARMS2* rs10490924 polymorphism.

Polimorfizm <i>HTRA1</i> rs11200638/ <i>HTRA1</i> rs11200638 polymorphism						
Genotyp/ Genotype	Grupa AMD/ AMD group	Grupa kontrolna/ Control group	Iloraz szans/ odds ratio	95% PU/ 95% CI		wartość p/ p value
				min	max	
AA	27 (26,0%)	1 (1,6%)	12,4615	1,5983	97,1585	0,0028
GG	25 (24,0%)	36 (59,0%)	0,3205	0,1587	0,6474	0,0000
AG	52 (50,0%)	24 (39,3%)		grupa odniesienia/ reference group		
Ogółem/ Total	104 (100%)	61 (100%)				

**Tab. II.** Liczba osób w grupie AMD i grupie kontrolnej z poszczególnymi genotypami polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 oraz wyniki równania regresji logistycznej dla poziomu odniesienia, którym jest genotyp AG.

**Tab. II.** AMD patients and controls with various genotypes of *HTRA1* rs11200638 polymorphism and results of logistic regression for the AG genotype reference group.

Polimorfizm <i>ARMS2</i> rs10490924/ <i>ARMS2</i> rs10490924 polymorphism						
Genotyp/ Genotype	Grupa AMD/ AMD group	Grupa kontrolna/ Control group	Iloraz szans/ odds ratio	95% PU/95% CI		wartość p/ p value
				min	max	
TT	29 (27,9%)	1 (1,6%)	13,9200	1,7884	108,3485	0,0021
GG	25 (24,0%)	36 (59%)	0,3333	0,1647	0,6747	0,0000
GT	50 (48,1%)	24 (39,3%)		grupa odniesienia/ reference group		
Ogółem/ Total	104 (100%)	61 (100%)				

**Tab. III.** Liczba osób w grupie AMD i grupie kontrolnej z poszczególnymi genotypami polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 oraz wyniki równania regresji logistycznej dla poziomu odniesienia, którym jest genotyp GT.

**Tab. III.** AMD patients and controls with various genotypes of *ARMS2* rs10490924 polymorphism and results of logistic regression for the GT genotype reference group.



mimo leczenia nie uzyskano poprawy funkcji leczonego oka, jak również nie stwierdzono poprawy morfologii dołka w badaniu OCT. Za brak poprawy funkcji uznawano brak poprawy BCVA lub jej pogorszenie w stosunku do badania wyjściowego o co najmniej 1 linię wg tablicy Snellena. Parametrami, za pomocą których oceniano morfologię dołka, były pomiar CRT oraz ocena ilości płynu śródsiatkówkowego pod częścią neurosensoryczną siatkówki oraz pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki (ang. Retinal Pigment Epithelium – RPE). Brak efektu leczenia definiowano jako brak zmian CRT lub redukcję CRT o mniej niż 50  $\mu\text{m}$ , utrzymujący się obrzęk płamki, płyn pod RPE i pod częścią neurosensoryczną siatkówki. Na podstawie obserwacji postępu leczenia w okresie 6 miesięcy prowadzonego badania stwierdzono, że genotyp AA polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 wykazywał tendencję do promowania niekorzystnej reakcji na wyniki leczenia anty-VEGF, ale bez istotności statystycznej. Spośród 22,11% chorych na AMD, u których nie stwierdzono pozytywnej reakcji na leczenie antyangiogenne („non-responders”), genotyp AA w polimorfizmie genu *HTRA1* rs11200638 był obecny u 59,26% tych pacjentów. Żaden z genotypów polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 nie miał wpływu na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

W badanej grupie chorych nie wykazano istnienia zależności między paleniem tytoniu a rozwojem choroby u osób będących homozygotami AA w polimorfizmie *HTRA1* rs11200638 oraz homozygotami TT polimorfizmie rs10490924 *ARMS2*.

### Omówienie

Wśród wielu czynników ryzyka rozwoju AMD, do których należą m.in. wiek, płeć żeńska, rasa biała, palenie tytoniu, wysoki poziom cholesterolu, nadciśnienie tętnicze, choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca, przewlekłe narażenie na działanie promieniowania słonecznego oraz dieta uboga w przeciwutleniacze i luteinę, w ostatnim czasie coraz większą rolę przypisuje się czynnikom genetycznym (1, 3, 17–19). Obecnie wiadomo, że zarówno patogenezą AMD i jej przebieg kliniczny, jak i odpowiedź na leczenie u chorych na AMD mogą być modyfikowane jednocześnie przez kilka polimorfizmów genowych, których efekty mogą na siebie wzajemnie oddziaływać (17, 19, 20). Te obserwacje zostały także potwierdzone w naszych wcześniejszych badaniach (21, 22). Identyfikacja określonych genów oraz zbadanie ich promującego lub protekcyjnego wpływu na rozwój i przebieg kliniczny AMD mogą mieć istotne znaczenie w prognozowaniu efektu leczenia u chorych obciążonych występowaniem predysponujących polimorfizmów genowych.

Bardzo silny związek z rozwojem AMD wykazuje gen *HTRA1* umiejscowiony na chromosomie 10q26.3 (23). Jest on odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy zewnątrzkomórkowej, a jego aktywność jako proteazy zewnątrzkomórkowej może mieć wpływ na rozwój neowaskularyzacji oraz na wzrost i przeżycie komórek poprzez hamowanie aktywności transformującego czynnika wzrostu (ang. Transforming Growth Factor  $\beta$  – TGF- $\beta$ ) (24, 25). Znane są cztery polimorfizmy pojedynczego nukleotydu genu *HTRA1*: rs11200638, rs2672598, rs1049331, rs2293870, które – jak wykazały wyniki badań – są silnie związane z rozwojem AMD (26–28). Spośród nich najistotniejsze znaczenie ma polimorfizm rs11200638 (26–28). Wysokim ryzy-

kiem rozwoju AMD są obciążone homozygoty AA w polimorfizmie rs11200638 *HTRA1*, lecz to ryzyko jest jeszcze większe, gdy homozygota AA jest palaczem tytoniu (29). Obecność allelu A polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 jest związana z występowaniem podwyższonego stężenia białka *HTRA1* w druzach, w RPE oraz w CNV. Uważa się zatem, że nadmierna ekspresja *HTRA1* może zmieniać integralność błony Brucha i przyspieszać rozwój CNV (30). W naszych badaniach genotyp AA w polimorfizmie *HTRA1* rs11200638 występował u 96,4% chorych na AMD i tylko u 3,6% osób z grupy kontrolnej. Choć w większości publikacji podkreśla się istnienie zależności między zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby u palaczy będących homozygotami AA rs11200638 *HTRA1*, u naszych chorych nie stwierdzono takiej zależności (26–29). Deangelis i wsp. poczynili obserwacje podobne do naszych, które także nie wykazały, aby palenie tytoniu było czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na AMD u osób będących homozygotami AA polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 (31).

W pojedynczych pracach opisano istnienie wpływu polimorfizmu *HTRA1* rs11200638 na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Park i wsp., Dedania i wsp. oraz Tian i wsp. wykazali, że wariant genu *HTRA1* rs11200638 był związany z wystąpieniem słabej reakcji na leczenie ranibizumabem lub bewacyzumabem u chorych na wysiękową postać AMD, podczas gdy Kloeckener-Gruissem i wsp. nie potwierdzili takiej zależności (17, 20, 32, 33). Podobnie Zhou i wsp. w metaanalizie obejmującej 1570 chorych na wysiękową postać AMD także nie wykazali farmakogenetycznego związku między polimorfizmem *HTRA1* rs1120638 a miejscowym leczeniem antyangiogennym u chorych na wysiękową postać AMD (34). Na podstawie naszych obserwacji postępu leczenia wykazano, że polimorfizm *HTRA1* rs11200638 w genotypie AA nie wykazywał istotnego statystycznie wpływu na wyniki leczenia, ale jego obecność była związana z tendencją do promowania niekorzystnej reakcji na terapię anty-VEGF. Genotyp AA polimorfizmie *HTRA1* rs11200638 był obecny u 59,26% chorych na AMD, spośród 23 (22,11%) wszystkich przebadanych, u których nie stwierdzono pozytywnej reakcji na leczenie antyangiogenne („non-responders”).

Bardzo silny związek z rozwojem AMD wykazuje gen *ARMS2*, lokalizowany na ogół w *locus* 10q26.13, który znajduje się w bliskim w sąsiedztwie *locus* genu *HTRA1*. Szczególnie polimorfizm rs10490924 *ARMS2* wykazuje silny związek z rozwojem AMD (35, 36). Występowanie genu *ARMS2* stwierdzono tylko u wyższych naczelnych i chociaż jego funkcja nie jest do końca poznana, sugeruje się, że jego aktywność może być związana z układem dopełniacza. Białko *ARMS2* bowiem aktywuje białko C3b układu dopełniacza, a to z kolei prowadzi do inicjowania zjawiska opsonizacji oraz zjawiska fagocytozy apoptycznych i martwiczych komórek (16). Białko *ARMS2* ulega ekspresji na powierzchni monocytów oraz na powierzchni komórek mikrogleju komórek siatkówki, zwłaszcza w warunkach stresu oksydacyjnego. U chorych będących homozygotami wariantu genowego *ARMS2* rs10490924 stwierdzono niedobór białka *ARMS2* na powierzchni monocytów i komórek mikrogleju siatkówki, to wiąże się z zaburzeniem fagocytozy i gromadzeniem się białek i lipidów w błonie Brucha, będących głównym składnikiem druz, pierwszego objawu AMD (16). Białko *ARMS2*

zatem bierze udział w usuwaniu resztkowych produktów przemiany materii z komórek siatkówki (16).

Dane z piśmiennictwa wskazują, że u homozygot TT w polimorfizmie *ARMS2* rs10490924 występuje 8–39-krotnie zwiększone ryzyko rozwoju AMD (19, 35, 36). W naszym materiale klinicznym obecność genotypu TT wariantu genowego *ARMS2* rs10490924 zwiększała ryzyko zachorowania 14-krotnie w porównaniu do ryzyka u osób bez tego genotypu.

W przypadku obydwu badanych polimorfizmów *HTRA1* rs12200638 oraz *ARMS2* rs10490924 nie wykazaliśmy zależności między występowaniem danego wariantu genowego a paleniem tytoniu, to zostało również potwierdzone obserwacjami, które opisywali Fritsche i wsp. (35). W większości publikacji jednak wskazano istnienie zależności między paleniem tytoniu a polimorfizmami *HTRA1* rs12200638 i *ARMS2* rs10490924 u osób będących homozygotami odpowiednio AA oraz TT (10, 12, 14, 16, 26, 36).

W literaturze przedmiotu znajduje się niewiele publikacji na temat wpływu polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na AMD (17–19). Bardak i wsp. po fazie nasycającej leczenia u chorych z genotypem TT polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 wykazali szybszą i lepszą reakcję na leczenie niż u chorych z genotypami GG i TG (19). Valverde-Megias i wsp. zaś odnotowali w okresie 2-letniej obserwacji, że homozygoty TT są obciążone większym ryzykiem nawrotu CNV i wymagają podania większej liczby doszkliskowych iniekcji czynnika anty-VEGF w porównaniu do osób bez tego genotypu (18). Park i wsp. stwierdzili natomiast, że genotyp GG polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 ma korzystny wpływ na regresję ognisk odłączenia RPE i odłączenia nabłonka pigmentowego (ang. Pigment Epithelium Detachment – PED) w oczach z polipoidalną waskulopatią naczyniówkową (ang. Polypoidal Choroidal Vasculopathy – PCV), która jest uważana za rzadszą postać CNV wtórną do AMD, częściej rozwijającą się u rasy żółtej niż białej (17). Według autorów pozostałe warianty genetyczne polimorfizmu *ARMS2* rs10490924, TT oraz TG nie miały istotnego związku farmakogenetycznego z reakcją na leczenie antyangiogenne (17). Choć polimorfizmy najważniejszych genów związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju AMD, takich jak: *ARMS2*, *HTRA1* i *CFH*, są powiązane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju PCV, ta zależność jest słabsza niż w przypadku AMD (37). Hagstrom i wsp. analizując kilka wariantów genowych u 834 chorych na AMD, nie wykazali istotnego wpływu polimorfizmu *ARMS2* rs10490924 na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na AMD, również ta obserwacja jest zgodna z naszymi obserwacjami (38).

## Wnioski

Wyniki naszych badań wykazały, że najważniejsze polimorfizmy genowe wykazujące silny związek z rozwojem AMD, takie jak *HTRA1* rs11200638 i *ARMS2* rs10490924, nie mają istotnego wpływu na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Nie można jednak wykluczyć, że inne mniej istotne polimorfizmy genowe o słabszym związku z rozwojem AMD mogą jednak modulująco wpływać na wyniki leczenia tego schorzenia. Poznanie genetycznych markerów wykazujących wpływ na wyniki miejscowej terapii anty-angiogennej i ich identyfikacja mogą być pomocne w optymalizacji leczenia prowadzonego u chorych na wysiękową postać AMD.

Praca powstała w ramach programu statutowego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum nr K/ZDS/006284.

## Piśmiennictwo:

1. Bressler NM, Bressler SB, Congdon NG: *Potential public health impact of age-related eye disease study results: AREDS Report No. 11*. Arch Ophthalmol. 2003; 121: 1621–1624.
2. Brown GC, Brown MM, Sharma S: *Age-Related Eye Disease Study Research Group The burden of age-related macular degeneration: a value-based analysis*. Curr Opin Ophthalmol. 2006; 17: 257–266.
3. Klein R, Klein BE, Linton KL: *Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study*. Ophthalmology. 1992 Jun; 99: 933–943.
4. Ferrara N: *Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy*. Nat Med. 2010; 16(10): 1107–1111.
5. Nguyen CL, Oh LJ, Wong E, Wei J, Chilov M: *Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration: a meta-analysis of randomized controlled trials*. BMC Ophthalmol. 2018 May 30; 18(1): 130. doi:10.1186/s12886-018-0785-3.
6. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T: *Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study*. Ophthalmology. 2009; 116(1): 57–65.e55.
7. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al.: *Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2006; 355(14): 1419–1431.
8. Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM: *Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet. 2005; 14: 2257–2264.
9. Yamashiro K, Mori K, Honda S, Kano M, Yanagi Y, Obana A, et al.: *A prospective multicenter study on genome wide associations to ranibizumab treatment outcome for age-related macular degeneration*. Scientific Reports. 2017; 7: 9196. doi:10.1038/s41598-017-09632-0.
10. Grassmann F, Heid IM, Weber BHF: *International AMD Genomics Consortium (IAMDGC). Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration*. Genetics. 2017; 205(2): 919–924.
11. Karkhane R, Ahmadraji A, Riaz Esfahani M, Roohipour R, Alami HZ, Lashay A, et al.: *Complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variant's frequencies and phenotypic associations in neovascular age-related macular degeneration, a pilot study*. J Curr Ophthalmol. 2016; 28(1): 32–36.
12. Leveziel N, Zerbib J, Richard F: *Genotype-phenotype correlations for exudative age-related macular degeneration associated with homozygous HTRA1 and CFH genotypes*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49: 3090–3094.
13. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA: *Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47: 536–540.
14. Chen W, Xu W, Tao Q, Liu J, Li X, Gan X, et al.: *Meta-analysis of the association of the HTRA1 polymorphisms with the risk*

- of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2009; 89: 292–300.
15. Spencer KL, Hauser MA, Olson LM: *Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration.* *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 971–977.
  16. Micklisch S, Lin Y, Jacob S, Karlstetter M, Dannhausen K, Dasari P, et al.: *Age-related macular degeneration associated polymorphism rs10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator.* *J Neuroinflammation.* 2017; 14: 4. <http://doi.org/10.1186/s12974-016-0776-3>
  17. Park UC, Shin JY, Chung H, Yu HG: *Association of ARMS2 genotype with response to anti-vascular endothelial growth factor treatment in polypoidal choroidal vasculopathy.* *BMC Ophthalmology.* 2017; 17: 241. doi:10.1186/s12886-017-0631-z.
  18. Valverde-Megías A, Veganzones-de-Castro S, Donate-López J, Maestro-de-Las-Casas ML, Megías-Fresno A, García-Feijoo J: *ARMS2 A69S polymorphism is associated with the number of ranibizumab injections needed for exudative age-related macular degeneration in a pro re nata regimen during 4 years of follow-up.* *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017; 255(11): 2091–2098.
  19. Bardak H, Bardak Y, Ercalik Y, Turkseven Kumral E, Imamoglu S, Gunay M, et al.: *Effect of ARMS2 gene polymorphism on intravitreal ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration.* *Genet Mol Res.* 2016; 19: 15(4). doi: 10.4238/gmr15049164.
  20. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, Schindler C, Kurz-Levin M, Michels S, et al.: *Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(7): 4694–4702.
  21. Kubicka-Trzaska A, Karska-Basta I, Dziedzina S, Sanak M, Romanowska-Dixon B: *Wpływ polimorfizmów genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyńowego VEGF-A na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD).* *Klin Oczna.* 2017; 119(2): 88–95.
  22. Kubicka-Trzaska A, Karska-Basta I, Dziedzina S, Sanak M, Romanowska-Dixon B: *Wpływ polimorfizmów Y402H, E318D oraz R102G genów kodujących białka układu dopełniacza na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD).* *Klin Oczna.* 2016; 118(2): 114–121.
  23. Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, et al.: *HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins.* *Development.* 2004; 131(5): 1041–1053.
  24. Friedrich U, Datta S, Schubert T, Plossl K, Schneider M, et al.: *Synonymous variants in HTRA1 implicated in AMD susceptibility impair its capacity to regulate TGF-β signaling.* *Hum Mol Genet.* 2015; 24: 6361–6373.
  25. Launay S, Maubert E, Lebeurrier N, Tennstaedt A, Campioni M, Docagne F, et al.: *HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival.* *Cell Death Differ.* 2008; 15(9): 1408–1416.
  26. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al.: *A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration.* *Science.* 2006; 314: 992–993.
  27. Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al.: *HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration.* *Science.* 2006; 314(5801): 989–992.
  28. Cameron DJ, Yang Z, Gibbs D, Chen H, Kaminoh Y, Jorgensen A, et al.: *HTRA1 variant confers similar risks to geographic atrophy and neovascular age-related macular degeneration.* *Cell Cycle.* 2007; 6(9): 1122–1125.
  29. Tam PO, Ng TK, Liu DT, Chan WM, Chiang SW, Chen LJ, et al.: *HTRA1 variants in exudative age-related macular degeneration and interactions with smoking and CFH.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(6): 2357–2365.
  30. Zhou Y, Chen CL, Wang YX, Tong Y, Fang XL, Li L, Wang Z: *Association between polymorphism rs11200638 in the HTRA1 gene and the response to anti-VEGF treatments of exudative AMD: a meta-analysis.* *BMC Ophthalmology.* 2017; 17: 97–106.
  31. Deangelis MM, Ji F, Adams S, Morrison MA, Harring AJ, Sweeney MO, et al.: *Alleles in the HtrA serine peptidase 1 gene alter the risk of neovascular age-related macular degeneration.* *Ophthalmology.* 2008; 115(7): 1209–1215.
  32. Dedania VS, Grob S, Zhang K, Bakri SJ: *Pharmacogenomics of response to anti-VEGF therapy in exudative age-related macular degeneration.* *Retina (Philadelphia, Pa).* 2015; 35(3): 381–391.
  33. Tian J, Qin X, Fang K, Chen Q, Hou J, Li J, et al.: *Association of genetic polymorphisms with response to bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration in the Chinese population.* *Pharmacogenomics.* 2012; 13(7): 779–787.
  34. Zhou Y, Chen CL, Wang YX, Tong Y, Fang XL, Li L, Wang Z: *Association between polymorphism rs11200638 in the HTRA1 gene and the response to anti-VEGF treatments of exudative AMD: a meta-analysis.* *BMC Ophthalmology.* 2017; 17: 97–106.
  35. Fritsche LG and the AMD Gene Consortium: *Seven new loci associated with age-related macular degeneration.* *Nat Genet.* 2013; 45: 433–439.
  36. Chakravarthy U, McKay GJ, de Jong PT, Rahu M, Seland J, Soubrane G, et al.: *ARMS2 increases the risk of early and late age-related macular degeneration in the European Eye Study.* *Ophthalmology.* 2013; 120(2): 342–348.
  37. Chen H, Liu K, Chen LJ, Hou P, Chen W, Pang CP: *Genetic associations in polypoidal choroidal vasculopathy: a systematic review and meta-analysis.* *Mol Vis.* 2012; 18: 816–829.
  38. Hagstrom SA, Ying G, Pauer GJ, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, et al.: *Pharmacogenetics for Genes Associated with Age-Related Macular Degeneration (AMD) in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT).* *Ophthalmology.* 2013; 120(3): 593–599.

Praca wpłynęła do Redakcji 06.09.2018 r. (KO-00180-2018)  
Zakwalifikowano do druku 17.02.2019 r.

**Adres do korespondencji (Reprint requests to):**  
dr hab. n. med. Agnieszka Kubicka-Trzaska  
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM  
ul. Kopernika 38  
31-501 Kraków  
e-mail: akubicka@onet.pl